

萱草花粉微管蛋白的体外聚合及电镜观察

廖俊杰^{1,2}, 吴英杰¹, 阎隆飞¹

(1 中国农业大学生物学院植物生理生化国家重点实验室, 北京 100094;

2 广东轻工职业技术学院食品与生物工程系, 广东 广州 510300)

摘要: 微管 (microtubule) 作为细胞骨架的主要成分, 在植物体内, 微管除决定细胞的形状外, 还参与很多重要的细胞功能。但有关微管蛋白生物化学的研究绝大多数来自动物脑组织材料, 对植物微管蛋白的研究除培养细胞外所知甚少, 我们纯化了毫克数量的萱草 (*Heimerocallis fulva* L.) 花粉微管蛋白, 利用紫杉醇作为促进剂, 在 Mg^{2+} 、GTP 等存在下体外聚合成功, 并观察了其电镜下的形态。

关键词: 萱草; 微管; 微管蛋白; 体外聚合; 电镜观察

中图分类号: Q 946

文献标识码: A

文章编号: 0253-2700(2005)06-0649-04

Polymerziton and Electron Microscopy of Tubulin of Pollens from *Heimerocallis fulva* in vitro^{*}

LIAO Jun-Jie^{1,2}, WU Ying-Jie¹, YEN Lung-Fei¹

(1 College of Biological Sciences, China Agricultural University, State Key Labratory of Plant Physiology

and Biochemistry, Beijing 100094, China; 2 Department of Food and Bio-technology,

Guangdong Light Industry Technologic College, Guangzhou 510300, China)

Abstract: Microtubules are the components of the cytoskeleton in all eukaryotic cells. They are essential for a wide varieties of cellular functions. Most of our knowledge of biochemistry and pharmacology of tubulin has come from extensive studies on mammalian brain microtubule systems, very little information exists on the biochemical and pharmacological properties of plant tubulin and microtubules. We developed an efficient method to prepare enough tubulin in high purity from day lily (*Heimerocallis fulva* L.) pollen. Here we reported the ultrastructural morphology of microtubule polymerized by induction of tubulin taxol in the presence of Mg^{2+} and GTP with transmission electron microscopy.

Key words: *Heimerocallis fulva*; Tubulin; Microtubule; Polymerziton; Electron microscopy

微管蛋白 (tubulin) 是所有真核生物细胞骨架蛋白的主要成分之一, 在细胞内通过聚合组装成中空的内径 15 nm, 外径 25 nm 的微管 (microtubule, MT) 骨架, 对维持细胞的形状、细胞壁的构建、细胞器的运动、细胞的分裂等重要生命活动起着重要作用 (Fosket,

基金项目: 国家自然科学基金资助 (39730280)

收稿日期: 2005-05-08, 2005-08-30 接受发表

作者简介: 廖俊杰 (1965-) 男, 副研究员, 主要从事植物细胞研究工作。E-mail: junjie33@gdqc.edu.cn

1992)。微管的形成是自我组装的过程，首先发生依赖于微管组织中心 (microtubule organizing centers, MTOC) 的成核反应，然后以核为基点生长 (Oakley 等, 1990)。微管本身是一种动态的结构，在与 MTOC 相连的 MT 末端 (正端)，不断有微管蛋白组装，而远离 MTOC 的一端 (负端)，则不断发生 MT 的解聚，这是微管所特有的 Treadmilling 特性，MT 两端的这种极性是遗传上所固有的 (Hotani and Aorio, 1988)。微管最显著的特征就是在一定条件下既可由 α 、 β 异二聚体微管蛋白聚合形成，又可解聚为微管蛋白异二聚体或单体 (Margolis and Wilson, 1978; Gelfand and Bershadsky, 1991)。Morejohn 和 Fosket (1982) 利用紫杉醇诱导玫瑰悬浮培养细胞微管蛋白体外聚合成微管。我们利用萱草花粉微管蛋白在 GTP、 Mg^{2+} 存在下，利用紫杉醇诱导体外聚合形成了微管，从而证明我们纯化的微管蛋白具有完整的生理功能。

1 材料与方法

1.1 材料

萱草 (*Heimerocallis fulva* L.) 花粉：采自中国医学科学院药用植物研究所及中国农业大学校园栽培的萱草，将花药收集后置于 60 W 灯光下照射，待花粉囊开裂后用分样筛收集花粉，干燥后贮于 -80 °C 冰箱中。

1.2 方法

萱草花粉微管蛋白的制备：花粉经破碎、提取制成丙酮粉后，重新溶解于 20 mmol/L BTP, pH 6.8, 内含 0.1 mmol/L EGTA, 0.1 mmol/L $MgCl_2$, 0.1 mmol/L DTT, 0.1 mmol/L PMSF, 5 μ g/ml TAME 和 5 μ g/ml TPCK 缓冲溶液中，再经硫酸铵分段盐析，透析后上 QAE-Sephadex A_{50} 柱分段洗脱，收集 0.8 mol/L KCl 洗脱峰 2。再将 QAE-Sephadex A_{50} 柱层析初步纯化的微管蛋白浓缩液上 FPLC Mono Q 柱线性梯度洗脱，最后得到纯化的萱草花粉微管蛋白，-70 °C 保存。

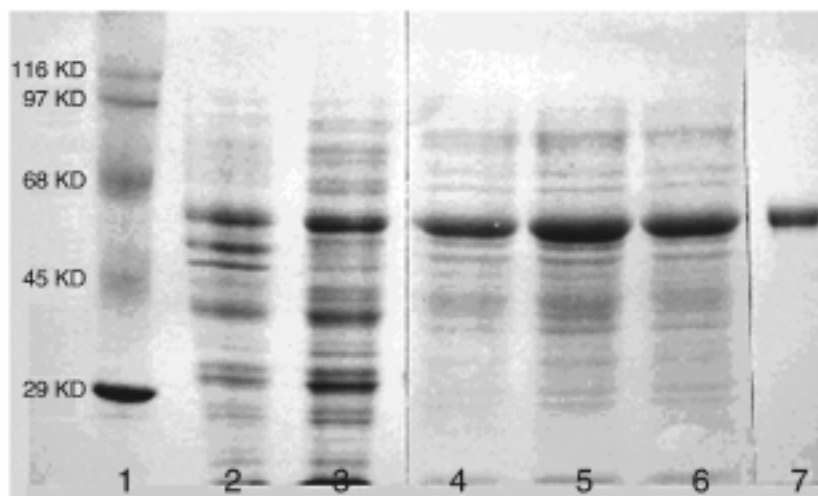


图 1 每一步纯化后的微管蛋白的 SDS-PAGE 电泳结果

1. Sigma 标准蛋白；2. 丙酮粉法提取的花粉总蛋白；3. 40%~70% 硫酸铵沉淀蛋白；4~6. 通过 QAE-Sephadex A_{50} 柱纯化蛋白；7. 通过 Mono Q 柱纯化蛋白

Fig. 1 SDS-PAGE of the tubulin of in each step of purification
lane 1. Sigma Mr. standard protein; lane 2. Total pollen proteins of acetone powder; lane 3. Fraction of 40%~70% $(NH_4)_2SO_4$ precipitate; lane 4-6. Proteins obtained by QAE-Sephadex A_{50} column; lane 7. Proteins obtained by Mono Q column

1.2.1 花粉微管蛋白的体外聚合 在纯化的花粉微管蛋白溶液中加入 3 mmol/L GTP, 2 mmol/L EGTA, 4 mmol/L $MgCl_2$, 1 mmol/L PMSF, 5 μ g/ml Leupeptin, 5 μ g/ml Pepstatin A, 20 μ mol/L Taxol, 在 30 °C 恒温水浴中放置 30 min, 使微管发生体外聚合。

1.2.2 体外聚合微管的电镜观察 将在体外聚合的萱草花粉微管溶液 1 滴 (3 μ l) 铺在 180 目喷碳的 Formvar 膜铜网上, 1 min 后用滤纸吸干, 水洗 1 min 再用滤纸吸干, 2% 醋酸铀负染 1 min, 灯光下烘干, 在 JEOL-200X 透射电子显微镜上观察微管的聚合状况。

1.2.3 微管蛋白的电镜观察 将纯化的微管蛋白溶液稀释后经 20 000 r/min 4 °C 离心 30 min, 取 3 μ l 上清液铺在经特殊处理的 180 目喷碳的 Formvar 膜铜网上, 1 min 后用滤纸吸干, 用 2% 醋酸铀负染 1 min, 干燥后用 JEOL-200X 电子显微镜观察微管蛋白分子的形状。

2 结果与分析

2.1 萱草花粉微管蛋白的纯化

利用萱草花粉为材料分步采用丙酮粉法、QAE-Sephadex A₅₀ 离子交换层析及 FPLC 技术作为主要分离纯化手段，获得了纯化的毫克数量微管蛋白。图 1 为纯化过程的 SDS-聚丙烯酰胺电泳结果。

从图 1 可见，经过 QAE-Sephadex A₅₀ 柱，微管蛋白得到了部分纯化，经凝胶扫描分析，其纯度约为 66.4%。再经过 Mono Q 柱纯化可得到电泳纯的微管蛋白样品。

2.2 萱草花粉微管的体外聚合

向纯化的花粉微管蛋白溶液中加入 taxol、GTP、EGTA、MgCl₂ 使其终浓度分别为 20 μmol L、3 mmol L、2 mmol L、4 mmol L 及蛋白酶抑制剂 1 mmol L PMSF，5 μg ml Leupeptin，5 μg ml Pepstatin A，在 30℃ 恒温下放置 30 min，使微管蛋白自发聚合组装成微管，醋酸铀负染后电子显微镜观察结果如图 2。

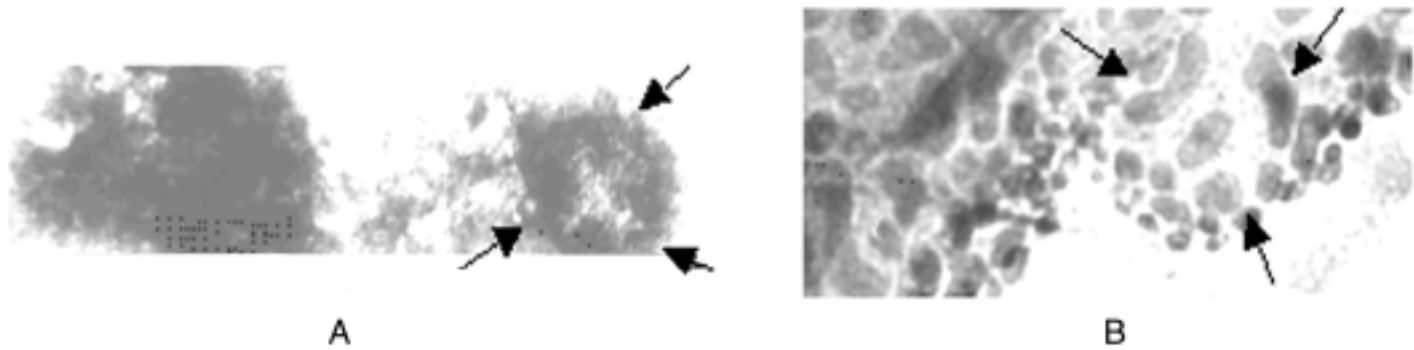


图 2 萱草花粉微管蛋白体外聚合成微管的电镜照片 A: 45 000 倍；B: 80 000 倍

Fig . 2 Electron micrographs of microtubule polymerized *in vitro* from tubulin highly purified from day lily pollen
A: 45 000 time; B: 80 000 time

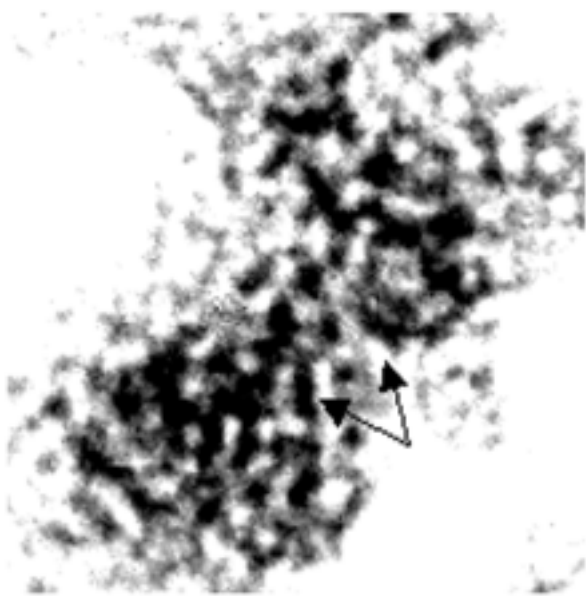


图 3 萱草花粉微管蛋白分子的电镜照片
(× 200 000)

Fig . 3 Electron micrographs (200 000 time) of
isolated tubulin molecules from day lily pollen

从电镜照片 A 上可见由微管原丝组成的微管，其直径为 25 nm（箭头所示）。与动植物细胞体内微管的直径一致，也与紫杉醇诱导动物、植物悬浮细胞微管蛋白体外聚合的微管结构十分相似，表明它们具有相同的聚合机制。

电镜照片 B 是正在聚合的微管，可见原丝正在逐渐合拢形成微管（箭头所示）。推测可能是原丝形成的片状结构变宽时，它们折叠形成微管。这可能为微管组装的模型之一——原丝片折叠成微管（Sheet folds into tube）（Dustin，1984）提供了一个佐证。

2.3 微管蛋白的电镜观察

3 μl 纯化的微管蛋白滴于铜网经醋酸铀负染后，通过电子显微镜观察结果见图 3。

从图 3 可见微管蛋白呈两个球状物连在一起

的结构。直径约 5 nm, 可能是 、 微管蛋白的两个亚基 (箭头所示)。由于未固定包埋, 分辨率低, 这里所示的只是一个初步的微管蛋白鉴定结构。

3 讨论

植物花粉在萌发后, 花粉管生长速度非常快, 细胞质运动非常旺盛, 是研究细胞运动的良好材料之一。Morejohn 和 Fosket (1982) 用悬浮培养的植物细胞微管蛋白完成了体外聚合。我们从萱草花粉中得到电泳纯化的微管蛋白, 在体外条件下, 能聚合成微管, 表明我们纯化的花粉微管蛋白具有完整的生物学活性。同时也表明, 花粉微管蛋白与植物细胞脱分化产生的悬浮细胞微管蛋白具有相同的聚合机制, 表现了遗传上的保守性。

微管蛋白体外组装成微管需要一定的条件。加入蛋白酶抑制剂 PMSF、TAME、Pepstatin A、Leupeptin 或乳清蛋白水解物、牛血清白蛋白等植物蛋白酶抑制剂能够抑制蛋白酶对微管组装的破坏; 加入紫杉醇用来作为微管聚合的促进剂, 一个分子的紫杉醇与一个二聚体微管蛋白结合能够聚集微管蛋白形成“核种”, 促进微管聚合的发生 (Shibacka and Nagai, 1994; Lamberf, 1993), 紫杉醇稳定微管需要 GTP 的参与 (Diaz and Andreu, 1993); Mg^{2+} 可能参与微管生长的调控 (Mizuno, 1993)。总之, 掌握微管蛋白聚合的条件是实现体外组装成功的先决因素。

〔参 考 文 献〕

- Diaz JF, Andreu JM, 1993 . Assembly of purified GDP tubulin into microtubules induced by taxol and taxotrer: reversibility, ligand stoichiometry and competition [J] . *Biochemistry*, 32: 2747—2755
- Dustin P, 1984 . Microtubules 2nd [M] . New York: Springer Verlag, 47—77
- Fosket DE, 1992 . Structural and functional organization of tubulin [J] . *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 43: 201—240
- Gelfand VI, Bershadsky AD, 1991 . Microtubule dynamics: Mechanism, regulation, and function [J] . *Annu Rev Cell Biol*, 7: 93—116
- Hotani H, Aorio T, 1988 . Dynamics of microtubules visualized by dark field microscopy treadmilling and dynamic instability [J] . *Cell Motil Cytoskeleton*, 10: 229—236
- Lamberf AM, 1993 . Microtubule organizing centers in higher plant [J] . *Curr Opin Cell Biol*, 5: 116—112
- Mandelkow E, Mandelkow EM, 1994 . Microtubule structure [J] . *Curr Opin Struc Biol*, 4: 171—179
- Margolis RL, Wilson L, 1978 . Opposite end assembly and disassembly of microtubules as steady state *in vitro* [J] . *Cell*, 13: 1—8
- Mizuno K, 1993 . Microtubule nucleation site on nuclei of higher plant cells [J] . *Protoplasma*, 173: 77—85
- Morejohn LC, Fosket DE, 1982 . Higher plant tubulin identified by self-assembly into microtubules *in vitro* [J] . *Nature*, 297: 426—428
- Oakley BR, Oakley CE, Yoon Y, *et al*, 1990 . α -tubulin is a component of the spindle pole body that is essential for microtubule function in *Aspergillus nidulans* [J] . *Cell*, 61: 1289—1301
- Shibacka H, Nagai R, 1994 . The plant cytoskeleton [J] . *Curr Opin Cell Biol*, 6: 10—15